Lane Medical Library

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München.
Direktor: Geheimrat Professor Dr. Otto Frank.

Ueber die Atmung einer Fermentlösung aus Hefe und ihre Deutung durch Dehydrierungsvorgänge.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der Zahnheilkunde

verfaßt und einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität in München

vorgelegt von

Otto Frey
appr. Zahnarzt aus Göppingen/Württ.

Druck von Johannes Jllig, Buch- und Offsetdruckerei, Göppingen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Referent: Prof. Dr. Amandus H a h n.
Korreferent: Geheimrat Prof. Dr. F r a n k.

Herrn Univ.-Professor Dr. med. et. med. dent.
Carl Hauenstein gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0380

I. Atmungstheorien

Von den Lebensäußerungen der Zelle interessiert in der chemischen Physiologie vor allem die Atmung. Daß diese eine biochemische Erscheinung ist, darauf weist schon Lavoisier hin, wenn er die Atmung als Verbrennung wertet. Der genauere Mechanismus dieser „Verbrennung", dieser biologischen Oxydation ist ein Problem, welchem es zu seiner Erklärung an Theorien nicht mangelt. Die Tatsache, daß der oxydative Abbau der meisten Stoffe, die die Zelle aufbaut, außerhalb des Körpers bei ungleich höheren Temperaturen vor sich geht, daß ferner der atmosphärische Sauerstoff mit anderen zelleigenen Substanzen außerhalb der Zelle fast überhaupt nicht reagiert, wird von all diesen Theorien berücksichtigt:

1. Die älteren Theorien, die man als Sauerstoffaktivierungstheorien zusammenfassen kann, sehen eine Aktivierung des reaktionsträgen Sauerstoffmoleküles innerhalb der Zelle durch irgendeinen Zellbestandteil vor. Soweit diese nicht schon früher verlassen wurden, sind sie durch neuerliche Erfahrungen, die das Experiment brachte, entkräftet.

Die heutigen Theorien, welche die langsame, bei niedriger Temperatur verlaufende Sauerstoffaufnahme erklären sollen, und die mehr oder weniger mit den neuesten Untersuchungen über den oxydativen Abbau der Zellsubstrate vereinbar sind, sind:

1. die Wieland'sche Dehydrierungstheorie,
2. die Warburg'sche Sauerstoffaktivierungstheorie und schließlich die von Szent-Györgyi vertretene
3. kombinierte Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierungstheorie.

Bei der folgenden Erörterung dieser Hypothesen beschränke ich mich auf ihr Prinzip und werde nur Beispiele bringen, soweit sie für das Verständnis und die Deutung meiner Versuche durch die Wieland'sche Theorie erforderlich sind.

1. Warburg'sche Sauerstoffaktivierungstheorie (29)

Warburg gibt in seiner Theorie sowohl eine Erklärung für den Ablauf der vitalen Oxydationen als auch für den Ort in der Zelle, wo sich dieser Vorgang abspielt. Nach ihm ist die Atmung eine kapillarchemische Erschei-

nung, die sich an den Oberflächen des eisenhaltigen Zellmaterials abspielt. Diese Eisenverbindungen sollen den indifferenten Sauerstoff für den Angriff auf die oxydierbaren Zellsubstanzen aktivieren. Das Prinzip dieser Aktivierung ist folgendes: Der molekulare Sauerstoff wird von niederen Oxydationsstufen der Eisenverbindungen gebunden. Das Eisen geht also in eine höhere Oxydationsstufe über. In diesem Zustand kann es mit den abbaufähigen Zellsubstanzen reagieren unter Reduktion der Eisenverbindungen zur ursprünglichen Oxydulstufe. Das Eisen übernimmt also bei diesem Vorgang die Rolle eines Katalysators. Um dieser Funktion genügen zu können, muß sich nach Warburg das Eisen in einer besonderen Form vorfinden.

Andererseits sollen die trägen, organischen Verbindungen durch Adsorption an den eisenhaltigen Oberflächen der festen Zellbestandteile dem Sauerstoff gegenüber reaktionsfähig gemacht werden.

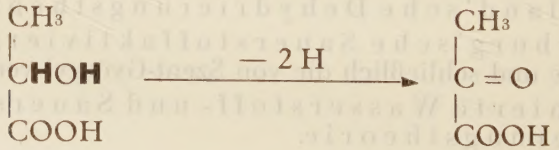
Nach Warburg ist also die Zellatmung eine Oberflächenkatalyse, für die er das Eisen verantwortlich macht. Er bezeichnet daher die Summe aller in der Zelle vorhandenen, katalytisch wirkenden Eisenverbindungen als „Atmungsferment". (27, 28)

Während sowohl alle älteren Theorien als auch die eben ausgeführte Aktivierungstheorie eine Umwandlung des molekularen Sauerstoffes in eine aktive Form verlangen, behauptet Wieland 1913 zum erstenmal, daß der Sauerstoff überhaupt nicht an dem Substratmolekül angreift, und daß die Zellfermente nicht an einer katalytischen Sauerstoffaktivierung beteiligt sind:

2. Wieland'sche Dehydrierungstheorie

Nach Wieland greifen die Zellfermente an den organischen Stoffen selbst an. Diese Substratveränderung kennzeichnet er als Dehydrierungsprozeß: Die Zellfermente, die Wieland Dehydrasen nennt, mobilisieren die an der Reaktion beteiligten Wasserstoffatome der oxydablen Substanz. Erst jetzt kann der molekulare Sauerstoff mit dem aktivierten Wasserstoff reagieren. Der Sauerstoff tritt also lediglich als Akzeptor für die frei werdenden Wasserstoffatome in Funktion:

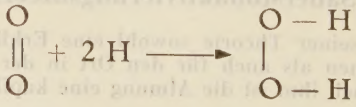
z. B.



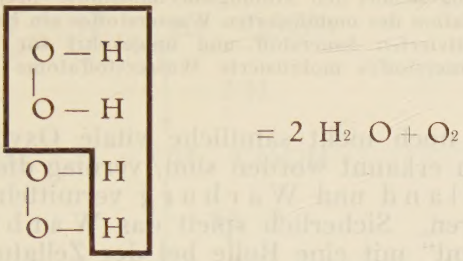
Milchsäure — Brenztraubensäure

Aus Milchsäure entsteht bei Gegenwart einer spezifischen Milchsäuredehydrase Brenztraubensäure.

An diese Funktion des Sauerstoffes ist die Entstehung von Wasserstoffsuperoxyd als Oxydationsprodukt des aktivierten Wasserstoffes gebunden:



Das entstehende Peroxyd wirkt im Zellorganismus aber giftig: Es wird daher von der, in der Zelle vorhandenen Katalase anschließend in Wasser und Sauerstoff zerlegt:



Die Katalase wirkt hier als Dehydrase, die den Wasserstoff des Peroxydmoleküles mobilisert. Dieser reduziert ein anderes Wasserstoffperoxydmolekül zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Der freiwerdende Sauerstoff kann jetzt seine Rolle als Wasserstoffakzeptor wieder übernehmen. Die Katalase, die hier als Dehydrase des Peroxyds fungiert, kann somit als Supplement zu den dehydrierenden Fermenten, die die Atmung unterhalten, gelten.

Die Tatsache, daß fermentative Oxydationen auch im Vakuum bei Gegenwart eines leicht hydrierbaren Stoffes wie Methylenblau und Orthodinitrobenzol vor sich gehen, ist eine der kräftigsten Stützen für Wielands Theorie. Diese Stoffe heißen im Gegensatz zu Sauerstoff künstliche Wasserstoffakzeptoren.

Wieland belegte seine Theorie mit Beispielen rein chemischer als auch organischer Oxydationen:

Zu erwähnen ist hier vor allem die Aufklärung der Schardingerschen Reaktion der Milch, die bei Gegenwart von Milch und Formaldehyd auf einer Reduktion des Methylenblau, welches hierbei in die farblose Leukobase übergeht, beruht. Diese Reaktion geschieht mit gekochter Milch nicht. Es muß somit in der ungekochten Milch ein Ferment vorhanden sein, welches beim Erhitzen zugrunde geht und welches Methylenblau unter gleichzeitiger Dehydrierung von Formaldehyd zu Ameisensäure reduziert. Wieland (31) gab der Milch Salicylaldehyd zu; er konnte zeigen, daß der zur Hydrierung des Methylenblau nötige Wasserstoff aus dem in der Milch gelösten Hydrat des Salicylaldehyds stammt. Dieses wird dabei zu Oxybenzoesäure oxydiert. Diese Beobachtung ließ Wieland in der Milch ein Ferment vermuten, das im Salicylaldehydhydratmolekül Wasserstoffatome aktivieren kann, die sich mit Methylenblau zum farblosen Leukomethylenblau verbinden.

Wieland zeigte weiter, daß die Essigsäurebildung aus Aethylalkohol durch Bacterium aceti nach dem Typus der Dehydrierung verläuft. Es gelang ihm die anaerobe Umwandlung von Aethylalkohol in Essigsäure bei Gegenwart von Essigbakterien und Methylenblau als künstlicher Wasserstoffakzeptor.

3. Kombinierte Wasserstoff-u. Sauerstoffaktivierungstheorie (23)

Nach Szent-Györgyi genügt weder die Wieland'sche noch die Warburg'sche Lehre. Erst das Ineinandergreifen von Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierung sichert den Atmungsmechanismus. Szent-Györgyi verlangt für die Oxydation des mobilisierten Wasserstoffes ein im Warburg-schen Sinne aktivierten Sauerstoff und umgekehrt für die Reduktion des aktivierten Sauerstoffes mobilisierte Wasserstoffatome des oxydablen Substratmoleküles.

Obwohl heute noch nicht sämtliche vitale Oxydationen als Dehydrierungen erkannt worden sind, vermag diese auch die zwischen Wieland und Warburg vermittelnde Theorie nicht zu erklären. Sicherlich spielt das Warburg'sche „Atmungsferment" mit eine Rolle bei der Zellatmung. Vielleicht aber weniger in seiner Funktion als Sauerstoffaktivator als in der Eigenschaft ebenso wie künstliche Wasserstoffakzeptoren als Wasserstoffakzeptor dienen zu können.

Anwendungen der Wieland'schen Dehydrierungstheorie

Die einfache Auslegung zelloxydativer Prozesse durch Wieland hat eine Reihe von Forschern zum Experiment angeregt:

Thunberg (25) und sein Schüler Ahlgreen (2) untersuchten die Reduktion von Methylenblau im Vakuum bei Gegenwart tierischer und pflanzlicher Substanzen und organischer Stoffe. An der erfolgten Entfärbung konnten sie nachweisen, daß Fettsäuren, Oxyfettsäuren, Dikarbonsäuren, Aminosäuren, Glutaminsäure und Alanin dehydriert werden.

Thunberg (24) hatte auch beobachtet, daß im Vakuum Methylenblau bei Gegenwart von Muskelgewebe und Bernsteinsäure entfärbt wird. Die Behauptung Bachs (4), daß diese Entfärbung gar nicht auf eine Dehydrierung der Bernsteinsäure zurückzuführen sei, hat Hahn und Mitarbeiter (9; 10) sowie Fischer (8) veranlaßt, den experimentellen Beweis zu führen, daß tatsächlich Bernsteinsäure zu Fumarsäure nach folgender Gleichung dehydriert wird.

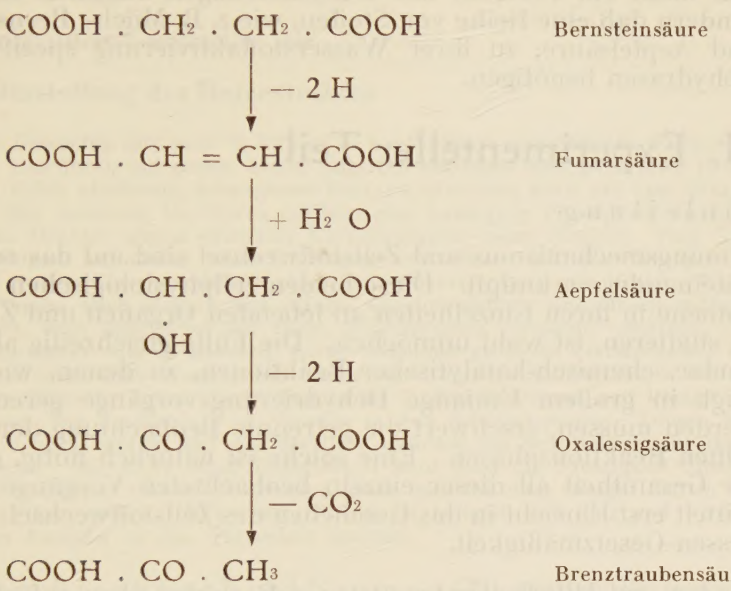
$$\underset{\text{Bernsteinsäure}}{COOH . CH_2 . CH_2 . COOH} \xrightarrow{-2H} \underset{\text{Fumarsäure}}{COOH . CH = CH . COOH}$$

Beide Forscher konnten gleichzeitig und unabhängig voneinander mittels eines besonderen Verfahrens die entstehende Fumar- und Aepfelsäure isolieren. Letztere entsteht durch fermentative Wasseranlagerung an die Doppelbindung der Fumarsäure. (5)

$$\underset{\text{Fumarsäure}}{COOH . CH=CH . COOH} \xrightarrow{+H_2O} \underset{\text{Aepfelsäure}}{COOH . CHOH . CH_2 . COOH}$$

Ueber den weiteren oxydativen Abbau der Aepfelsäure stellten Hahn, Fischbach und Haarmann (11; 13; 15) Versuche an. Sie brachten den exakten Beweis, daß als erstes Dehydrierungsprodukt beim Abbau der Aepfelsäure Oxalessigsäure entsteht. Hahn und Mitarbeiter konn-

ten weiter zeigen, daß dieser Stoff sehr leicht Kohlendioxyd abspaltet und durch eine nichtfermentative Katalyse in Brenztraubensäure übergeht. Sie haben also folgende zeitliche Folge bei der Dehydrierung der Bernsteinsäure feststellen können:



In weiteren Arbeiten über Dehydrierungsvorgänge im Muskel gelang es Hahn, Fischbach und Haarmann (12; 14) Milchsäure bei Gegenwart von Muskelbrei zu Brenztraubensäure zu dehydrieren:

$$CH_3 . CHOH . COOH \quad - 2\,H \longrightarrow \quad CH_3 . CO . COOH$$

Hahn und Haarmann zeigten ferner, daß Zitronensäure (16) im Muskel bei Gegenwart von Methylenblau durch Dehydrierung in Brenztraubensäure übergeht und wiesen auch nach, daß der Abbau von Glyzerinphosphorsäure, Fruktose- und Hexosediphosphorsäure (17) im Muskelbrei bei Gegenwart von Methylenblau nach dem Typus der Dehydrierung verläuft. Dabei entsteht wiederum Brenztraubensäure. Die entstehenden Zwischenstufen sind allerdings noch nicht bekannt.

Von der Tatsache ausgehend, daß Muskelkochsaft die Atmung ausgewaschener Muskulatur, die nicht mehr atmen kann, von neuem in Gang bringt, isolierten Hahn, Fischbach und Haarmann (18) aus Muskelkochsaft Adenylsäure und Laktazidogen. Sie untersuchten diese beiden Stoffe auf ihre Oxydierbarkeit durch Fermente und kamen zu dem Ergebnis, daß sich im ausgewaschenen Muskel bei Anwesenheit von Methylenblau aus Adenylsäure Brenztraubensäure bildet, daß ferner Laktazidogen durch unausgewaschene Muskulatur bei Gegenwart eines künstlichen Wasserstoffakzeptors zu Brenztraubensäure abgebaut wird.

Hahn und Mitarbeiter konnten aber in diesen Arbeiten nicht allein eine Reihe organischer Substanzen als intermediäre Stoffwechselprodukte, die durch Dehydrierung aus den Mutter-

substanzen entstehen, festlegen. Ihre Untersuchungen brachten ferner neue experimentelle Beweise für die Existenz spezifisch wirkender, dehydrierender Fermente, womit sie zeigten, daß nicht ein Ferment alle Dehydrierungen zustande bringt, sondern daß eine Reihe von Stoffen, wie z. B. Milch-, Bernstein- und Aepfelsäure, zu ihrer Wasserstoffaktivierung spezifische Dehydrasen benötigen.

II. Experimenteller Teil

Einleitung

Atmungsmechanismus und Zellstoffwechsel sind auf das engste miteinander verknüpft. Diese beiden zellphysiologischen Phänomene in ihren Einzelheiten an lebenden Organen und Zellen zu studieren, ist wohl unmöglich. Die Fülle gleichzeitig ablaufender, chemisch-katalytischer Reaktionen, zu denen, wie gezeigt, in großem Umfange Dehydrierungsvorgänge gerechnet werden müssen, erschwert die getrennte Beobachtung der einzelnen Reaktionsphasen. Eine solche ist natürlich nötig, denn die Gesamtheit all dieser einzeln beobachteten Vorgänge vermittelt erst Einsicht in das Geschehen des Zellstoffwechsels und dessen Gesetzmäßigkeit.

Hahn und Mitarbeiter benützten z. B. zu den oben aufgeführten Arbeiten Muskelbrei. Dieses Versuchsmaterial enthält eine Reihe Fermente, oxydabler und unbekannter Stoffe. Es waren daher jeweils geeignete Vorbehandlungen des Muskelgewebes und Methoden zur Ausschaltung störender Reaktionen notwendig.

Ein solch komplizierter Vorgang wie die Atmung bedarf ferner zu seiner Klärung der verschiedensten Methoden. Dadurch, daß man dieses Problem von möglichst vielen Seiten bearbeitet, bekommt man Resultate, die sich ergänzen oder die gegenseitige Kontrolle erlauben.

So bedienten sich Hahn und Mitarbeiter mehr oder weniger der qualitativen und quantitativen Analyse der intermediären Stoffwechselprodukte, auf Grund welcher sie über den Oxydationsmechanismus Aufschluß erhielten.

Meiner Arbeit liegt eine andere Methode zugrunde: Durch experimentelle Bestimmung der Sauerstoffzehrung einer, durch Chemikalien und organische Substanzen beeinflußten Fermentlösung wird versucht, ihr Atmungsmechanismus durch die Wieland'sche Theorie zu deuten.

Zu den Atmungsversuchen benützte ich den von Hahn (20) angegebenen Hefeextrakt. Es ist dies eine zellose Fermentlösung, die also nach meinen obigen Ausführungen als Versuchsobjekt besonders geeignet ist.

Im folgenden beschreibe ich

die Herstellung des Hefeextraktes

In ein Glasgefäß gibt man ½ kg frische Preßhefe und 36,5 ccm Essigester. Unter Umrühren mit einem dicken Glasstab bekommt man nach etwa 10 Minuten einen zähflüssig, homogenen Brei, zu dem man noch 416 ccm Wasser gibt. Bei weiterem Verrühren entsteht eine homogene Flüssigkeit, die nach einigen Minuten gegen neutrales Lackmuspapier sauer reagiert. Nun wird mit 5%igem Ammoniak unter Umrühren neutralisiert und die Flüssigkeit in einer großen Flasche mittelst einer Schüttelvorrichtung geschüttelt. Da in der Flasche nach einiger Zeit infolge Gasentwicklung eine Druckerhöhung entsteht, muß man diese mit einem Ventilstopfen versehen. Anfangs wird die Flüssigkeit alle 10 Minuten, später in immer größeren Zeitabständen mit 5%igem Ammoniak neutralisiert. Am ersten Tag wird die Flasche 8—9 Stunden geschüttelt. Ueber Nacht kommt sie in den Kühlraum und kommt am nächsten Tag nochmals 2—3 Stunden in den Schüttelapparat. Diesen läßt man so rasch laufen, daß sich die Hefe während des Schüttelns nicht absetzen kann. Mit Hilfe eines Faltenfilters wird jetzt die Flüssigkeit filtriert. Um den Extrakt zellfrei zu erhalten, gießt man ihn nach einiger Zeit in das alte Filter zurück. Das zweite Filtrat ist hellgelb und klar und wird in diesem Zustand zu den Versuchen benützt.

Hahn, Fischbach und Niemer (20) prüften die fermentative Wirksamkeit dieser Hefeextrakte nach der Thunberg'schen Methode, die auf der Methylenblauentfärbung beruht. Sie fanden, daß der Extrakt selbst nach 3 Tagen kaum gelitten hatte, d. h. die Milchsäuredehydrase des Extraktes war noch so wirksam, daß der künstliche Wasserstoffakzeptor hydriert werden konnte.

Da ich im Laufe meiner Arbeit einige Mikroversuche nach der Thunberg'schen Methode bringe, führe ich ihre Technik nach der von Hahn und Mitarbeitern angegebenen Modifikation aus:

Den zu untersuchenden Ansatz gibt man in ein Reagensglas, welches mit einem Ventilstopfen versehen wird. Der mittlere Teil des Reagensglases wird über der Flamme eines Bunsenbrenners unter beständigem Rotieren zu einer engen Glasröhre ausgezogen. Nach Abkühlung des Glases wird der Ventilstopfen mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. Während jetzt evakuiert wird, bleibt der Boden des Reagensglases in kaltes Wasser getaucht, damit die Flüssigkeit nicht verdunstet. Sobald das, mit Gefäß und Wasserstrahlpumpe verbundene Manometer, das Vakuum anzeigt, wird die ausgezogene Röhre in der Flamme zugeschmolzen. Das evakuierte Reagensglas wird nach seiner Abkühlung mit einem Bleihütchen versehen und in das Wasserbad von 37° C gestellt. Der Thermostat hat Glaswände, so daß man die Entfärbung in diesem beobachten kann. Die Entfärbungszeit gibt Aufschluß über die Wirksamkeit des Extraktes.

Den Atmungsversuchen lag eine manometrische Methode (1) zugrunde, deren Prinzip und Apparate ich jetzt schildere:

Prinzip der Methode

Der zu untersuchende Hefeextrakt wird während der ganzen Versuchsdauer mit Sauerstoff gesättigt, indem man ihn in einem, mit Sauerstoff angefüllten, abgeschlossenen Gefäße schüttelt. Der Sauerstoffverbrauch zeigt sich dann durch eine Druckabnahme im Gefäß an, welches mit einem Manometer verbunden ist. Da sich bei dem chemischen Umsatz, der sich in der Fermentlösung abspielt, Kohlensäure bildet, würde diese an Stelle des verbrauchten Sauerstoffes treten und eine Druckabnahme wäre dann nicht meßbar. Es muß daher die Kohlensäure chemisch gebunden werden durch Absorption in 30%iger Kaliumlauge.

Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, daß man die Sauerstoffzehrung dauernd ablesen kann. Eine ständige Beobachtung erlaubt aber, und das kann mitunter besonders wichtig sein, eine Kontrolle über die Oxydationsgeschwindigkeit. Diese läßt im Laufe des Versuches erkennen, ob dauernde, gleichmäßige oder stationäre Verhältnisse vorliegen.

Apparate

Die Form des Gefäßes, in das der Extrakt kommt, gleicht den Siebeckschen Manometergefäßen. Es ist dies ein kegelförmiges Glasgefäß, in dessen planen Boden senkrecht zu diesem ein Glasröhrchen mit etwa 5 mm lichter Weite eingeschmolzen ist. Ein Drittel dieser Röhre ragt vom Boden des Gefäßes nach unten und ist zugeschmolzen. Der Rest der Röhre ist in dem Gefäßlumen und ist oben offen. In diese Röhre kommen Lauge und 1—2 Glaskapillaren. Letztere dienen zur Vergrößerung der Laugenoberfläche und damit zu einer besseren Absorption der Kohlensäure. Die kegelförmige Gefäßform bedingt einen großen Gefäßboden. Der Sauerstoff kommt also während der Schüttelung mit einer großen Extraktoberfläche in Berührung, so daß die Sauerstoffsättigung des Extraktes leichter ermöglicht wird. Das Manometergefäß hat noch einen Zulauf für Sauerstoff, der durch einen Hahnen abgesperrt werden kann.

Zu den Versuchen benützte ich Barcroftmanometer mit Nelkenöl als Sperrflüssigkeit. Der eine Schenkel des Manometers ist offen, der andere, zweimal rechtwinklig abgebogene Schenkel kann durch einen Glasschliff geschlossen und geöffnet werden. Durch Drehen einer Schraube wird die Manometerfüllung eingestellt.

Gefäß und Manometer sind durch ein Ansatzstück miteinander verbunden; dies wird mit einem eng anliegenden Gummischlauch an dem Ende des abgewinkelten Manometerschenkels befestigt. Das andere Ende des Ansatzstückes hat einen Glasschliff, der in die Oeffnung des oben beschriebenen Gefäßes paßt. An das Gefäß und Ansatzstück sind je zwei Glashaken angeschmolzen. Damit sich beim Schütteln des Gefäßes dieses vom Ansatzstück nicht lockert, werden jeweils die gegenüberliegenden Haken mit Spiralfederchen verbunden.

Die an den Manometern befestigten Gefäße tauchen während des Versuches in einen Wasserthermostaten. Es ist dies ein Behälter, dessen Wasser während des Versuches auf einer bestimmten Temperatur gehalten wird.

Die Einrichtung des Thermostaten

Die Form des Thermostaten ist zylindrig. Im Mittelpunkt seines Bodens ruht in einem Lager eine senkrechte gut zentrierte, drehbare Metallachse, die durch Schnurlauf von einem Motor getrieben wird. Das obere Ende der Achse wird durch ein an den Thermostaten montiertes Stativ gehalten. Zur guten Durchmischung des Wassers trägt die Achse in ihrem unteren Teile wasserradähnliche Metallflügel. Die Schüttelvorrichtung wurde aus praktischen Erwägungen modifiziert: An der rotierenden Achse ist ein in der Höhe verstellbares Drahtkreuz angebracht. An die Enden dieses Kreuzes werden senkrecht dazu Stücke eines Gummischlauches aufgesteckt. Zu diesem Zweck wird der Gummi in der Mitte durchlocht. Er ist ferner in seiner Längsrichtung durchschnitten, wodurch er federnder wird. Bei Rotation des Drahtkreuzes streifen diese Gummistücke an dem unteren Teil der Manometergefäße. Der Vorteil dieser Modifikation liegt in einer raschen Regulierung der Schüttelung auch während des Versuches, wobei man unabhängig ist von der jeweiligen Höhe der Gefäße und ihrer Höhe im Thermostaten. Gerade die Schüttelung der Gefäße verlangt besondere Sorgfalt. Zu schwaches Schütteln bedingt eine ungenügende Sauerstoffversorgung des Extraktes, während bei starkem Anschlag an das Gefäß der Schliff des Ansatzstückes gelockert werden kann oder Extrakt in das Laugengefäß gelangt, wodurch die Kohlensäureabsorption gehemmt wird.

Ausführung eines Versuches

Zu den Versuchen dürfen nur gut gereinigte und getrocknete Gefäße verwendet werden. In das Laugengefäß pipettiert man 0,2 ccm KOH (30%ig) und gibt 1—2 Glaskapillaren hinzu. Diese dürfen nicht ganz bis an die Oeffnung heranreichen. Nun kommt der zu untersuchende Extrakt mit seinen Zusätzen in das Gefäß. Nach Reinigung der Gefäßöffnung mit Fließpapier wird der Schliff des Ansatzstückes eingefettet und daran das Manometergefäß vorsichtig aufgedreht und mit den Federn befestigt. Der Zulaufhahn für Sauerstoff ist offen und wird durch eine Schlauchverbindung an ein Sauerstoffgasometer angeschlossen. Das Manometer wird jetzt außerhalb des Thermostaten an diesem senkrecht befestigt. Das Gefäß taucht bis über den Schliff des Ansatzstückes in das Wasser. Nun leitet man 15 Minuten lang Sauerstoff durch das Gefäß, welcher aus dem offenen Manometerhahnen entströmen kann. Die Extraktoberfläche wird durch die Schüttelung immer erneuert, so daß die Flüssigkeit sich mit Sauerstoff sättigt. Während man den Sauerstoffzulauf des Manometergefäßes schließt, stellt man die Schüttelvorrichtung ab. Dadurch vermeidet man ein Ueberlaufen des Extraktes in das Laugengefäß. Erst jetzt schließt man das Gasometer. Der Manometerhahn bleibt noch einige Minuten offen, bis sich der Ueberdruck in dem Gefäß ausgleicht. — Die Temperatur muß jetzt im Thermostaten konstant sein. Die Versuchstemperaturen lagen zwischen 19 ° C und 23 ° C. — Kleinere Temperaturschwankungen wurden durch ein, als Thermobarometer benütztes Manometergefäß und Barcroftmanometer korrigiert, indem ich die Temperatur konstant hielt. Nun schließt man den Manometerhahnen und den Hahnen des Thermobarometers, nachdem man vorher das Nelkenöl auf eine bestimmte Marke einstellt. (Am besten auf die Mitte der von 0 ° bis 30 ° geeichten Manometerskala.) Die Zeit des Versuchbeginnes wird notiert. Während des Versuches kontrolliert man ab und zu, ob die Gefäße richtig geschüttelt werden. Nach Beendigung des Versuches wird die Flüssigkeitssäule des mit dem Gefäße verbundenen Manometerschenkels wieder auf die ursprüngliche Marke eingestellt und die Druckdifferenz durch Subtraktion der beiden Flüssigkeitssäulen bestimmt.

Berechnung des Sauerstoffverbrauches

Die Sauerstoffzehrung im Gefäße bedingt eine Druckabnahme. Da die Kohlensäure in dem Laugengefäß absorbiert wird und das Gefäßvolumen konstant bleibt, kann man aus dem Gefäßvolumen und der Druckdifferenz bei Anwendung des Boyle-Mariotte'schen und des Gay-Lussac'schen Gesetzes den Sauerstoffverbrauch nach folgender Formel berechnen:

$$\nabla V \frac{273 \cdot \nabla p \cdot V}{T \cdot \pi} \text{ ; wobei}$$

∇V = verbrauchtes Volumen O_2 bei 0° C und 1 Atm.,
∇p = Druckabnahme in mm Nelkenöl,
π = Druck 1 Atm. in mm Nelkenöl = (9702),
T = absolute Temperatur.
V = ursprüngliches Volumen (Gefäßvolumen + Volumen des Manometerrohres bis Beginn der Sperrflüssigkeit unter Abzug der Zutaten wie 0,2 ccm KOH, Extrakt, Puffer, Methylenblau usf.

III. Versuche und ihre Deutung durch Dehydrierungsvorgänge.

Der Einfluß des Sauerstoffs auf den Hefeextrakt

wurde in Versuchen folgender Zusammensetzung untersucht:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm (2%) Lithiumlaktatlösung.

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7{,}0$).

Die Versuche I und II liefen gleichzeitig und gleich lang. Dies gilt für alle folgenden Versuche.

Die Versuchsresultate enthält Tabelle 1:

Tabelle 1

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		I mit Laktat	II ohne Laktat	
1	1	62,6	44,7	Extrakt frisch
2	1	40,1	42,8	„ 5 Std. alt
3	1 1/2	44,7	45,5	„ 24 Std. alt
4	1 1/2	34,1	35,7	„ 30 Std. alt
5	1	64,0	49,2	Extrakt frisch
6	1	44,1	50,6	„ 5 Std. alt
7	1 1/2	33,4	32,7	„ 24 Std. alt
8	1 1/2	26,9	27,8	„ 30 Std. alt

Wie aus Spalte II Tabelle 1 ersichtlich ist, hat Hefeextrakt eine meßbare Sauerstoffzehrung, die mit dem Alter der Fermentlösung abnimmt.

Dieser Sauerstoffverbrauch ist nicht mehr an die Zellstruktur der lebenden Hefezelle gebunden und könnte daher auf bakterielle Verunreinigungen zurückgeführt werden. Die geringe Sauerstoffzehrung läßt dies sehr wohl vermuten. Wenn man an dieser Annahme festhält, müßte allerdings bei Berücksichtigung des Bakterienwachstumes der Sauerstoffverbrauch mit dem Alter des Extraktes zunehmen. Diese Auslegung der Extraktatmung steht aber im Widerspruch zu der eben gemachten Feststellung, wonach die Atmungsgröße mit dem Alter des Extraktes abnimmt.

Die Möglichkeit, daß der Sauerstoffverbrauch durch Hefezellen oder Zellfragmente bedingt ist, die beim Filtrieren in den Extrakt kommen, scheidet aus. Das zweite Filtrat läßt im Mikroskop weder intakte Zellen noch Zellfragmente erkennen.

Nach dem eben Gesagten läßt die Sauerstoffzehrung wohl am ehesten den Schluß zu, daß es sich bei der Extraktatmung um chemisch-katalytische Umsetzungen handelt, die mit Sauerstoffverbrauch einhergehen:

Es könnten dies irgendwelche Reaktionen sein, die sich in Gegenwart von Stoffen abspielen, die im Extrakt gelöst sind. Wenn dazu aber Sauerstoff erforderlich ist, sind dabei natürlich Oxydationsvorgänge beteiligt.

Diese chemische Umsetzung einer Fermentlösung könnte auch Dehydrierungsvorgängen gleichkommen, zumal ja von Hahn, Fischbach und Niemer (19; 20) im Hefeextrakt Milchsäuredehydrase nachgewiesen ist. In Anlehnung daran wäre der Sauerstoff entsprechend der Wieland'schen Theorie als natürlicher Wasserstoffakzeptor für die mobilisierten Wasserstoffatome von Donatorsubstanzen im Extrakt verwendet worden.

Die Sauerstoffzehrung des Hefeextraktes ist gering, liegt aber nicht mehr innerhalb der Fehlergrenze. Dieser Sauerstoffverbrauch wird, wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, durch Zugabe von Methylenblau beträchtlich gesteigert. Bekanntlich kann Methylenblau infolge seiner Reduzierbarkeit in den Atmungsmechanismus eingreifen (3). Ich zeigte weiter, daß der ohnedies geringe Sauerstoffverbrauch mit dem Alter des Extraktes abnimmt. Diese Abnahme wird aber mit Hefeextrakt beobachtet, in dem nach Hahn, Fischbach und

Niemer (20) die noch gut wirksame Milchsäuredehydrase enthalten ist. Milchsäure und der nach Wieland als natürlicher Wasserstoffakzeptor wirkende Sauerstoff waren ebenfalls in den Versuchen mit 1 Tag alten Extrakt vorhanden. Aus dem eben Gesagten und der Atmungssteigerung durch Methylenblau erhellt, daß diese Bedingungen für den Dehydrierungsmechanismus nach Wieland für die Erklärung der Sauerstoffzehrung des Hefeextraktes anscheinend nicht ausreichen. Somit ergibt sich die Notwendigkeit, in der frischen Fermentlösung einen „Stoff" zu vermuten, der neben Milchsäure, Milchsäuredehydrase und Sauerstoff für die Oxydation der Milchsäure nötig ist und der durch das Alter des Extraktes an Wirksamkeit verliert.

Mit dieser Hypothese erhebt sich aber die Frage, welche Rolle diesem „Stoff" beim oxydativen Abbau der Milchsäure zukommt: Sauerstoff dürfen wir bei der Extraktatmung wohl nicht als Wasserstoffakzeptor annehmen, denn es wäre nicht einzusehen, warum dieser im alten Extrakt seiner Funktion nicht ebenso gerecht werden könnte. Vielleicht kommt dem besagten „Stoff", welchen ich mit dem indifferenten Namen „Sauerstoffüberträger" belege, analog dem Methylenblau die Rolle eines Wasserstoffakzeptors zu.

Welcher Art kann nun der sauerstoffübertragende Mechanismus sein?

Im Warburg'schen Sinne könnte der Sauerstoffüberträger den molekularen Sauerstoff aktivieren. Die Extraktatmung wäre also eine Eisenkatalyse.

Wenn dem Sauerstoffüberträger aber eine wasserstoffakzeptierende Wirkung zukommt, welche Rolle übernimmt dann der Sauerstoff im Atmungsmechanismus der Extraktatmung?

Zur Beantwortung dieser Frage können die Entfärbungsversuche mit Methylenblau als künstlicher Wasserstoffakzeptor in Gegenwart von Extrakt dienen: Man weiß, daß sich hier bei anaeroben Bedingungen das farblose Leukomethylenblau bildet, welches bei Anwesenheit von molekularem Sauerstoff wieder zum ursprünglichen Methylenblau oxydiert wird. Die oxydierte Leukobase kann also erneut in den Dehydrierungsmechanismus eingreifen. Man kann gleichsam von einer „Regeneration" des Wasserstoffakzeptors sprechen. Wendet man diesen Modellversuch auf den Sauerstoffüberträger im Extrakt an, so wird ganz analog der atmosphärische Sauerstoff zur Regeneration des Sauerstoffüberträgers verbraucht.

Hahn, Fischbach und Niemer (20) fanden den Einfluß von Sauerstoff auf Hefeextrakt praktisch gleich Null. Die geringe Milchsäureabnahme veranlaßt Hahn und Mitarbeiter zu dem Schluß, daß der Einfluß des Sauerstoffes auf den Extrakt nicht mit Sicherheit zu erkennen sei.

Die Sauerstoffzehrung entspricht ja auch tatsächlich einer Milchsäureabnahme, die bei Milchsäurebestimmungsversuchen in den Bereich der Fehlergrenze fällt. Die von mir beobachtete Sauerstoffzehrung steht allerdings im Einklang mit dem von Hahn, Fischbach und Niemer (20) festgestellten Ueberwiegen einer leichten Milchsäureabnahme.

Auf Grund dieser Erscheinung folgere ich, daß im Extrakt nur Spuren eines Sauerstoffüberträgers vorhanden sind.

Aus Spalte I Tabelle 1 ist ersichtlich, daß ein Zusatz von 2%iger Lithiumlaktatlösung zum frischen Extrakt die Sauerstoffzehrung um 30—40% zu steigern vermag. Diese Zunahme wird bereits bei Milchsäurezusatz zu einigen Stunden altem Extrakt vermißt. Die Werte sind hier im Gegenteil immer etwas kleiner als im Parallelversuch ohne Laktat. Wie sind diese Erscheinungen zu erklären?

Die Atmungssteigerung beim frischen Extrakt durch Milchsäurezugabe kann einerseits dadurch bedingt sein, daß im Parallelversuch ohne Laktat weniger Milchsäure vorhanden ist als in Gegenwart des Sauerstoffüberträgers oxydiert werden könnte. Andererseits ist es aber auch denkbar, daß ein Ueberschuß an Milchsäure an und für sich atmungsfördernd wirkt. Die Anreicherung von Milchsäure im Extrakt zur optimalen Konzentration würde also den Ablauf der Atmung beschleunigen.

Warum bekommt man aber bei einigen Stunden altem Extrakt durch Milchsäureanreicherung keine Steigerung mehr? Die Dehydrierung der Donatorsubstanzen kommt erst zustande, wenn ein funktionstüchtiger Sauerstoffüberträger für die Aufnahme der mobilisierten Wasserstoffatome bereit ist. Fehlt ein solcher oder hat er wie im alten Hefeextrakt an seiner Qualität eingebüßt, dann kommt trotz Gegenwart dehydrierender Fermente, trotz Anreicherung der Fermentlösung an Milchsäure keine vermehrte Dehydrierung der Milchsäure mehr zustande. Weiter unten rechtfertige ich diese Ansicht durch Versuche.

Ueber die Wirkung künstlicher Wasserstoffakzeptoren auf Hefeextrakt bei Gegenwart von Sauerstoff.

1. Der Einfluß von Methylenblau auf Hefeextrakt

Hahn, Fischbach und Niemer (19) bestimmten in zahlreichen Versuchen die Milchsäureabnahme im Extrakt bei Gegenwart von Methylenblau. Sie fanden, daß die Milchsäure regelmäßig abnahm. Siehe Tabelle 2.

Die Ansätze für die Milchsäurebestimmung hatten die Zusammensetzung:

12 ccm Extrakt,
15 ccm Methylenblaulösung (1,2 5%) in Phosphatpuffer (m/15; $p_H = 7$)
3 ccm Lithiumlaktatlösung 2%ig.

Die Ansätze wurden im Vakuum bei 35° C geschüttelt.

Tabelle 2
(mg Milchsäure)

Direkt . . .	80,56	65,20	71,84	66,24	68,00	93,52	70,80	70,40
nach Digestion .	70,43	36,70	58,16	45,20	55,36	67,60	54,60	46,30
Dauer (h) . .	2	6	5	3½	4	3½	4	4½

Der Sauerstoffverbrauch der Extraktatmung bei Gegenwart von Methylenblau wurde in folgender Versuchszusammensetzung gemessen:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2%ig + 0,5 ccm Methylenblaulösung (1,25%) in Phosphatpufferlsg. (m/15; $p_H = 7$).

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2%ig + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Die Versuchsergebnisse zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		mit Methylenblau	ohne Methylenblau	
1	110	206,1	59,1	Extrakt frisch
2	100	197,8	38,2	„ frisch
3	100	159,4	36,0	„ 5 Std. alt
4	120	193,2	34,4	„ 5 Std. alt
5	115	187,7	32,6	„ 24 Std. alt
6	120	63,4	26,0	„ 4 Tage alt

Die Atmung bei Gegenwart von Methylenblau als künstlicher Wasserstoffakzeptor ist in den Versuchen 1—5 zirka 4 — 5 mal so groß wie der Sauerstoffverbrauch ohne Methylenblau. Dies stimmt also mit der von Hahn und Mitarbeitern bestimmten Milchsäureabnahme überein. Selbst in 4 Tage altem Extrakt, in dem der Sauerstoffüberträger kaum mehr wirkt, und in dem auch die Milchsäuredehydrase gelitten hat, bringt Methylenblau noch eine Atmungssteigerung, d. h., Methylenblau kann an Stelle des fast wirkungslosen Sauerstoffüberträgers im Extrakt treten.

Anhang

Ich führte oben aus, daß Laktatzugabe zu einigen Stunden altem Extrakt keine Steigerung mehr bringen kann, weil der Sauerstoffüberträger im Extrakt bereits in seiner Wirkung geschädigt wurde. Trifft dies zu, dann muß Milchsäurezugabe erneut eine Steigerung verursachen, sobald man den trägen Sauerstoffüberträger durch Methylenblau ersetzt.

Die beiden Versuche von Tabelle 4, die folgend zusammengesetzt waren, bestätigen dies und sprechen daher für die Annahme eines Sauerstoffüberträgers im Hefeextrakt.

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung (1,25%) + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung (2%ig).

Manometergefäß II enthielt: 1.0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung (1,25%) + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 4

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		Methylenblau mit Laktat	Methylenblau ohne Laktat	
1	70	118,2	38,5	Extrakt 3 Tage alt
2	80	143,1	46,7	„ 2 Tage alt

2. Der Einfluß von O = Dinitrobenzol auf Hefeextrakt

In Versuchen folgender Zusammensetzung benützte ich das von Lipschitz angegebene O = Dinitrobenzol als Wasserstoffakzeptor:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm O = Dinitrobenzolsuspension (0,5 g auf 15 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Manometergefäß II enthielt: 1.0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 5

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit 0 = Dinitrobenzol	ohne 0 = Dinitrobenzol
1	1½	73,5	68,7
2	1	49,0	44,0
2	1	62,7	56,1

0 = Dinitrobenzol bringt lediglich die Andeutung einer sehr geringen Steigerung des Sauerstoffverbrauches, die eigentlich innerhalb der Fehlergrenze liegt. Dinitrobenzol kann den Versuchen infolge seiner Unlöslichkeit nur als Suspension zugesetzt werden; diese setzt sich dann am Boden des Manometergefäßes ab. Die Schüttelung der Gefäße kann nicht so kräftig sein, daß das Dinitrobenzol in Suspension bleibt.

Hahn, Fischbach und Niemer (20) fanden bei Verwendung von 0 = Dinitrobenzol eine Milchsäureabnahme, die außerhalb der Fehlergrenze liegt. Doch war hier die Abnahme der Milchsäure bedeutend geringer als bei den Methylenblauansätzen. Daß mit Dinitrobenzol überhaupt noch eine Abnahme meßbar war, liegt wohl an einer viel besseren Schüttelung der Ansätze im Thermostaten, als dies bei Manometerversuchen möglich ist.

3. Der Einfluß von Brenzkatechin auf Hefeextrakt:

Für den Hefeextrakt habe ich die Hypothese gemacht, daß der Transport der mobilisierten Wasserstoffatome nicht direkt von der oxydablen Substanz zum molekularen Sauerstoff erfolgt, sondern daß ein Sauerstoffüberträger den intermediären Wasserstofftransport besorgt.

Einen Sauerstoffüberträger, welcher den intermediären Wasserstofftransport bewerkstelligt, scheinen bei gewissen biologischen Oxydationen reversible Beziehungen zwischen Polyphenolmolekülen und Chinon abzugeben. Diese Beziehungen sind von einer Phenoloxydase abhängig. Wäre im Hefeextrakt eine Phenoldehydrase, so würde das zugesetzte Brenzkatechin (Diphenol) zu Chinon dehydriert. Chinon ist aber in manchen Fällen als künstlicher Wasserstoffakzeptor wirksam.

Die Wirkung von Brenzkatechin wurde in folgenden Versuchen festgestellt:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Brenzkatechinlösung 2% + 0,5 ccm Laktatlösung 2%.

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$) + 0,5 ccm Laktatlösung 2%ig.

Die Resultate von Tabelle 6 lassen erkennen, daß Brenzkatechin die Extraktatmung weder fördert noch hemmt. Im Hefeextrakt ist somit eine Phenoloxydase nicht enthalten.

Tabelle 6

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Brenzkatechin	ohne Brenzkatechin
1	95	50,5	66,0
2	60	24,5	24,7
3	70	46,2	43,7

4. Der Einfluß von Glutathion auf Hefeextrakt:

Das von Hopkins (21) 1921 entdeckte Glutathion, ein Tripeptid aus Cystein, Glutaminsäure und Glykokoll, welches er u. a. aus Hefe isolierte, soll in oxydierter Form als intermediärer Wasserstoffträger für eine Reihe biologischer Prozesse Bedeutung haben.

Auf die Extraktatmung jedenfalls hatte das oxydierte Glutathion keinen Einfluß. (Siehe Tabelle 7.)

Versuchszusammensetzung:

Manometergefäß I enthielt: 1 ccm Extrakt + 1 ccm Glutathion.

Manometergefäß II enthielt: 1 ccm Extrakt + 1 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 7

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Glutathion	ohne Glutathion
1	1	34,4	27,4
2	1	26,1	31,7
3	1	33,8	35,9

Oxydiertes Glutathion kann also nicht als Wasserstoffakzeptor wirken.

Ueber den Einfluß von Cyankalium auf Hefeextrakt.

1. Der Einfluß von Kaliumcyanid auf die Methylenblauatmung des Hefeextraktes:

Blausäure vergiftet den Zellorganismus. Sowohl Wieland wie Warburg geben eine Erklärung für den Mechanismus der Blausäurevergiftung:

Nach Wieland vergiftet die Blausäure die im Zellorganismus vorhandene Katalase. Das bei der Dehydrierung der abbaufähigen Substanzen entstehende Wasserstoffperoxyd kann infolgedessen nicht mehr reduziert werden. Die Anreicherung von Hydroperoxyd wirkt aber giftig.

Auch Warburgs Theorie (26) der Blausäurevergiftung steht in engstem Zusammenhang mit seiner Atmungstheorie: Nach ihm wird die Blausäure von den eisenhaltigen Zellbestandteilen adsorbiert. Dadurch wird die oxydable Substanz von seinem Oxydationsorte verdrängt und die Sauerstoffaktivierung sistiert.

Aus Tabelle 8 geht hervor, daß Kaliumcyanid die Methylenblauatmung des Extraktes nicht ganz aufhebt, aber sie doch zu ca. 50% hemmt.

Welcher Art ist wohl die Schädigung der blausäurevergifteten Methylenblauatmung des Extraktes?

Man könnte sich vorstellen, daß Methylenblau von Cyankalium chemisch verändert wird, wodurch es seine Fähigkeit als Wasserstoffakzeptor einbüßt. Dies ist aber nicht der Fall, denn KCN ist gegen Methylenblau indifferent.

Eine andere Möglichkeit wäre die, ob das bei der Reduktion von Methylenblau entstehende Leukomethylenblau bei Gegenwart von KCN von dem Sauerstoff rasch genug regeneriert werden kann. Davon überzeugte ich mich in zwei Mikroversuchen folgender gleicher Zusammensetzung:

0,2 ccm Extrakt,
0,8 ccm Lithiumlaktatlösung 2%,
0,2 ccm Methylenblaulösung 1 : 1000.

Nach beinahe gleichzeitiger Entfärbung in den beiden evakuierten Reagensgläsern, ließ ich in beide Luft einströmen und gab zu einem Entfärbungsversuch 0,5 ccm einer n/2,5 KCN-Lösung. Die Regeneration der Leukobase erfolgte in beiden Versuchen zu gleicher Zeit.

Da die Atmung aber nur noch 50% von der nicht vergifteten beträgt, so muß das KCN an der Dehydrierungsphase angegriffen haben. Diese Hemmung in der Dehydrierung beobachtete ich auch wieder an zwei Entfärbungsversuchen:

Mikroversuch 1: 0.2 ccm Extrakt + 0,2 ccm Methylenblaulösung 1 : 1000 + 0,8 ccm Lithiumlaktatlösung 2% + 0,2 ccm n/2,5 KCN-Lösung.

Mikroversuch 2: 0.2 ccm Extrakt + 0,2 ccm Methylenblaulösung 1 : 1000 + 0,8 ccm Lithiumlaktatlösung 2%.

Mikroversuch 2 hatte eine Entfärbungszeit von 15 Minuten, während Mikroversuch 1 erst nach einer Stunde 20 Minuten entfärbt war.

Ueber die Schädigung der Dehydrierungsphase durch n/10 KCN-Lösung:

Eine direkte Schädigung der Dehydrasen ist kaum anzunehmen, denn es wäre nicht einzusehen, daß ein chemischer Stoff wie KCN, wenn er schon ein Ferment chemisch verändert, dieses nur teilweise schädigt.

Die starke Alkaleszenz, die n/10 KCN-Lösung infolge Hydrolyse verursacht, ist natürlich eine Milieuveränderung in der Fermentlösung, bei welcher die Dehydrierungsphase in der Aktivierung der Wasserstoffatome gestört ist, obwohl im selben Milieu die Regeneration der Leukobase gut vonstatten geht.

Die restlose Entfärbung im Mikroversuch 2 läßt jedoch erkennen, daß die Dehydrierung bis zum völligen Verbrauch des Methylenblau statt hatte, und daß sie also nicht schon eher still stand. Das entspricht meiner Beobachtung bei den Manometerversuchen: Der Sauerstoffverbrauch hörte hier nicht etwa nach einer gewissen Zeit auf, sondern war bis Versuchsende gleichmäßig fortschreitend.

Versuchsansätze für Tabelle 8:

Manometergefäß I enthielt: 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2% + 0,5 ccm n/2,5 KCN-Lösung.

Manometergefäß II enthielt: 0.5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 8

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Methylenblau mit Cyankalium	Methylenblau ohne Cyankalium
1	140	52,2	124
2	125	66,3	120,9
3	125	59,7	108,4

2. Der Einfluß von Cyankalium auf die Extraktatmung ohne Zusatz eines künstlichen Wasserstoffakzeptors.

Nachdem man jetzt von der vergifteten Methylenblauatmung des Extraktes weiß, daß selbst bei Anwendung einer n 10 KCN-Lösung (n/10 = Konzentration im gesamten Ansatz) noch Dehydrierung möglich ist, war es interessant, die Blausäurewirkung an der reinen Extraktatmung zu untersuchen:

Die Versuchsansätze waren folgend zusammengestellt:

Manometergefäß I enthielt: 1.5 ccm Extrakt + 0.5 ccm n/2.5 KCN-Lösung.
Manometergefäß II enthielt: 1.5 ccm Extrakt + 0.5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 9

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Cyankalium	ohne Cyankalium
1	140	33,2	125,1
2	120	24,8	113,7
3	100	19,3	65,3

Aus Versuchstabelle 9 ergibt sich, daß KCN die reine Extraktatmung hemmt. Diese Hemmung beträgt aber nicht nur mehr 50% wie bei der cyanvergifteten Methylenblauatmung, sondern 70% — 80%.

Wie erklärt sich diese vermehrte Atmungshemmung?

Sicher ist, daß die Dehydrierung nicht mehr geschädigt wird als bei der cyanvergifteten Methylenblauatmung. Im Gegenteil, zu den Versuchen der Tabelle 9 kommen auf 1,5 ccm Extrakt 0,5 ccm einer n/2,5 KCN-Lösung, während dieselbe Menge in den Versuchen der Tabelle 8 auf 0.5 ccm Extrakt kommt.

Es kann also die stärkere Hemmung nur noch an einem verschiedenen Verhalten des Sauerstoffüberträgers und des

künstlichen Wasserstoffakzeptors zu KCN liegen. Anscheinend ist der Sauerstoffüberträger Blausäure gegenüber nicht so indifferent wie es Methylenblau ist. Wenn natürlich die geringen Spuren des Sauerstoffüberträgers in ihrer Funktion behindert sind, leidet auch die Dehydrierung der Donatorsubstanzen.

Bei Beobachtung des Manometers sah man, daß nach einer gewissen Zeit, nachdem eben der Sauerstoffüberträger vernichtet war, der Sauerstoffverbrauch fast ganz aufhörte. Diese Beobachtung bestätigt nicht nur das vorhin Gesagte, sie läßt auch vermuten, daß Cyankalium den Sauerstoffüberträger nicht plötzlich vernichtet, und daß darauf die restliche Extraktatmung beruht, die nach Zusatz von KCN bestehen bleibt. In letzter Zeit wurde allerdings häufig gefunden, daß ein kleiner Teil der organischen Atmung gegen KCN resistent ist, für diesen also das Warburg'sche Atmungsferment nicht in Frage kommt. Warburg (30) selber hat im sogenannten „zweiten" Atmungsferment einen Katalysator beschrieben, welcher Sauerstoff auf Zuckerphosphate überträgt. Dieser Vorgang ist resistent gegen KCN. Vor allem hat Bertho (6), ein Schüler Wielands, für gewisse Bakterien gezeigt, daß diese ohne jedes Atmungsferment im Sinne Warburgs Sauerstoff aufnehmen, ein Vorgang, der ganz resistent gegen KCN ist.

Aus meinen Ausführungen geht noch hervor, daß die Milchsäuredehydrase gegen Blausäure resistenter ist als der Sauerstoffüberträger der Fermentlösung. Ueber das Verhalten der Blausäure bezüglich der Wirkung anderer dehydrierender Fermente sagen die Versuche nichts aus.

Interessant ist schließlich noch die Erscheinung, daß die Vergiftung der Extraktatmung nicht an das Vorhandensein elektiver Oberflächen fester Zellbestandteile für die Adsorption der Blausäure gebunden ist.

Ueber den Einfluß von Phenylurethan auf Hefeextrakt.

Die Ester der Carbaminsäure wirken als Narcotica auf die Zellatmung hemmend.

Nach Warburg (26) werden Narcotica von den festen Zellbestandteilen adsorbiert. Sie bedecken also gerade die aktivierende Oberfläche für die oxydablen Stoffe und verdrängen so diese Substanzen. Die Atmungsgröße wird dadurch herabgesetzt, und zwar in dem Maß als das Narcoticum von der Oberfläche der festen Zellbestandteile adsorbiert wird.

Zunächst untersuchte ich die Wirkung des Phenylurethans auf eine frische Hefesuspension, die aus 0,3 g Hefe und 40 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$) hergestellt wurde.

Manometergefäß I enthielt: 2.0 ccm Suspension + 1.0 ccm n 640 Phenylurethanlösung.

Manometergefäß II enthielt: 2.0 ccm Suspension + 1.0 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Die Versuchsresultate enthält Tabelle 10. Aus diesen geht hervor, daß die Atmung der Zellsuspension um ca. 50% geschädigt ist.

Tabelle 10

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Phenylurethan	ohne Phenylurethan
1	35	124	206
2	30	124	206
3	25	103,2	195,8

Das Narcoticum braucht zu seiner Wirkung eine Oberfläche, die ihm die festen Zellbestandteile bieten. Wie verhält sich aber das Urethan zur reinen Extraktatmung und zur Methylenblauatmung des Extraktes, einer zellfreien Fermentlösung, die dem Phenylurethan keine Angriffsfläche bietet?

Diese Versuche wurden in folgender Zusammensetzung ausgeführt:

Manometergefäß I enthielt: 1.5 ccm Extrakt + 0.5 ccm n 640 Phenylurethanlösung.

Manometergefäß II enthielt: 1.5 ccm Extrakt + 0.5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Die Resultate enthält Tabelle 11.

Tabelle 11

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Phenylurethan	ohne Phenylurethan
1	90	79,7	89,4
2	60	58,2	62,1
3	70	64,7	66,8

Der Einfluß des Phenylurethans auf die Methylenblauatmung des Extraktes ist aus Tabelle 12 ersichtlich.

Versuchszusammensetzung für Tabelle 12:

Manometergefäß I enthielt: 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2% + 0,5 ccm n/640 Phenylurethanlösung.

Manometergefäß II enthielt: 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Lithiumlaktatlösung 2% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 12

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Methylenblau mit Phenylurethan	Methylenblau ohne Phenylurethan
1	60	125,4	123,7
2	90	163,7	167,2
3	40	59,1	63,4

Vorstehende Versuche von Tabelle 11 und Tabelle 12 zeigen, daß weder die reine Extraktatmung noch die Methylenblauatmung des Extraktes durch den Phenylcarbaminsäureäthylester narkotisiert werden.

Dies liegt daran, daß in der Fermentlösung keine festen Zellbestandteile noch Zellfragmente sind, die das Phenylurethan zur Entfaltung bringen könnten. Hierin sehe ich eine Stütze für meine Ansicht, daß es sich bei der Extraktatmung um rein chemisch-katalytische, extrazelluläre Reaktionen handelt.

Meine Untersuchungen zeigen dadurch auch, daß die Extraktatmung keine Bakterienatmung ist.

Meyerhof (22) stellte bei Narkotisierung lebender Coccen mit gesättigter Phenylurethanlösung eine 73%ige Atmungshemmung fest. Für unerhitzte Acetoncoccen war die Hemmung 75%ig, während sie für erhitzte Acetoncoccen nur noch 35% betrug. Wäre die Extraktatmung einer Bakterienatmung gleichzusetzen, dann müßte nach den Untersuchungen Meyerhofs die Extraktatmung durch Phenylurethan norkotisiert werden.

Ueber den Einfluß von Muskelkochsaft auf Hefeextrakt

Zur Herstellung des zu folgenden Versuchen benützten Kochsaftes verwendete ich 250 g von Fett und Faszie gesäubertes Rindfleisch und ebensoviel Wasser, das bis zum Sieden erhitzt wurde. Der Muskel wurde durch die Fleischmaschine getrieben und unter Umrühren sofort in das siedende Wasser ge-

geben. Man ließ den Muskelbrei 5 Minuten lang aufkochen und preßte den Kochsaft mit einem Koliertuch gut ab. Der abgekühlte Kochsaft wurde zu den Versuchen verwendet.

Der erste Atmungsversuch mit Kochsaft hatte die Zusammensetzung:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 1,0 ccm Kochsaft.
Manometergefäß II enthielt: 1 ccm Extrakt + 1 ccm Lithiumlaktatlösg. 1%.

Mit Kochsaft betrug der Sauerstoffverbrauch nach 2 Stunden 192 cmm, während er im Parallelversuch ohne Kochsaft nur 82,2 cmm betrug.

Wie kommt der gesteigerte Sauerstoffverbrauch bei Gegenwart von Kochsaft zustande?

Durch fermentativen Einfluß des Kochsaftes auf die Fermentlösung kann die vermehrte Sauerstoffzehrung nicht bedingt sein, denn die Fermente des Muskels werden beim Kochen zerstört.

Vielleicht ist im Kochsaft mehr Milchsäure enthalten als in dem Parallelversuch, zu welchem man 1 ccm einer 1%igen Laktatlösung gegeben hat. Ein Versuch, den ich mit 5%iger Lithiumlaktatlösung anstellte, konnte aber die Sauerstoffzehrung der „Kochsaftatmung" auch nicht erreichen. Ein Milchsäuremangel liegt demgemäß nicht vor. Außerdem erreichte man, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, mit Laktat diese große Sauerstoffzehrung wie bei der „Kochsaftatmung" bei weitem nicht (siehe Tabelle 13). Die „Kochsaftatmung" zeigt aber noch eine weitere interessante Erscheinung:

Oben erwähnte ich, daß ein Laktatzusatz zu einigen Stunden altem Extrakt keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches mehr bringt, und daß diese erst wieder zu erreichen ist, wenn man Methylenblau als künstlichen Wasserstoffakzeptor zufügt. Kochsaft dagegen bringt ohne Zusatz von Methylenblau auch noch bei älterem Extrakt eine beträchtliche Steigerung. Sie ist allerdings geringer als bei Gegenwart von frischem Extrakt. Diese Erscheinungen versuche ich weiter unten zu erklären.

Der Sauerstoffmehrverbrauch hängt also nicht mit Milchsäuredehydrierung zusammen. Nachdem Hahn, Fischbach und Haarmann (18) feststellten, daß Muskelkochsaft die Atmung ausgewaschener Muskulatur, die die Fähigheit zu atmen verloren hat, von neuem in Gang bringt, daß ferner zwei im Kochsaft vorhandene Substanzen, nämlich Lak-

tazidogen und Adenylsäure, durch Dehydrierung in Gegenwart von Methylenblau und unausgewaschener bzw. ausgewaschener Muskulatur zu Brenztraubensäure oxydiert werden, lag es nahe, die Steigerung des Sauerstoffverbrauches durch Kochsaft auf Konto der Dehydrierung der Kochsaftbrennstoffe zu setzen.

Wenn man aber die atmungssteigernde Wirkung des Kochsaftes auf Dehydrierungsvorgänge zurückführt, welche noch neben dem Milchsäureabbau (Kochsaft enthält 8% Milchsäure) (18) statthaben, wird es sofort einleuchtend, daß auch keine konzentrierte Laktatlösung den Kochsaft bezüglich seiner atmungsfördernden Qualität ersetzen kann. Hahn und Mitarbeiter (18) legen die Dehydrasen für Laktazidogen und Adenylsäure als spezifisch fest. Sind solche spezifische Enzyme in der Fermentlösung vorhanden, so können diese freilich nur in Funktion treten, wenn „Brennstoffe", wie sie im Kochsaft sind, zum Extrakt gegeben werden. Gibt man diesen spezifischen Dehydrasen keinen Angriffspunkt, dann nehmen sie am Atmungsmechanismus nicht teil.

Versuche der Tabelle 13 und ihre Zusammensetzung:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 1,0 ccm Kochsaft.
Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 1,0 ccm Lithiumlaktatlösung 2%ig.

Tabelle 13

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm mit Kochsaft	O_2 = Verbrauch in cmm ohne Kochsaft	Bemerkungen
1	120	173	61,8	Extrakt frisch
2	90	118,2	44,0	„ 5 Std. alt
3	110	183,1	69,7	„ frisch
4	90	204,4	61,8	„ „
5	120	216,2	71,5	„ „
6	150	260,9	78,3	„ „

Ueber den Einfluß von Cyankalium auf die „Kochsaftatmung"

Die Wirkung von Cyankalium auf die „Kochsaftatmung" wurde in Versuchen folgender Zusammensetzung festgestellt:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm n/2,5 KCN-Lösung (Konzentration im gesamten Ansatz = n/10).
Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Die Resultate enthält Tabelle 14.

Tabelle 14

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Kochsaft mit Cyankalium	Kochsaft ohne Cyankalium
1	1½	19,2	100,9
2	2	22,3	136,7

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich ist, wird auch die „Kochsaftatmung" durch Kaliumcyanid lahmgelegt.

Wodurch ist dieser Atmungsstillstand bedingt?

Ich machte oben die Hypothese, daß KCN die geringen Spuren des Sauerstoffüberträgers, welche die reine Extraktatmung unterhalten, unwirksam macht. Analog diesem Vorgang kann die Hemmung der „Kochsaftatmung" als eine Vergiftung des Sauerstoffüberträgers gedeutet werden; wenn dies aber die Ursache für diese Atmungshemmung wäre, müßte natürlich Methylenblau den Ausfall des Sauerstoffüberträgers kompensieren können.

Diese Frage untersuchte ich in folgenden Versuchen:

Manometergefäß I enthielt: 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm n/2,5 KCN-Lösung + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%.

Manometergefäß II enthielt: 0,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm n/2,5 KCN-Lösung + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Die Resultate dieser Versuche enthält Tabelle 15.

Tabelle 15

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Cyankalium mit Methylenblau	Cyankalium ohne Methylenblau
1	130	41,8	15,1
2	150	53,2	16,7

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich ist, kompensiert Methylenblau die vergiftete „Kochsaftatmung" nur teilweise. Ich komme darauf weiter unten noch zurück.

Hahn, Fischbach und Haarmann (18) führen die atmungssteigernde Wirkung des Kochsaftes auf ausgewaschene Muskulatur teilweise auf das im Kochsaft enthaltene Lak-

tazidogen und die Adenylsäure zurück. Es war daher interessant, Versuche über die Wirkung dieser Substanzen auf den Extrakt anzustellen.

Ueber den Einfluß von Laktazidogen auf Hefeextrakt

Für die Versuche zersetzte ich das von H a h n und Mitarbeiter (18) aus Muskelkochsaft durch Fällung mit Trichloressigsäure, mit Merkuriazetat und Bleiessig isolierte laktazidogensaure Barium mit Schwefelsäure und neutralisierte das Filtrat mit Natriumlauge. Das laktazidogensaure Natrium kam in 2%iger Lösung zur Verwendung. Für die Versuche war

Manometergefäß I mit 1.5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Laktazidogen-Na 2%.
Manometergefäß II mit 1.5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

beschickt.

Die Resultate stehen in Tabelle 16.

T a b e l l e 16

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		mit Laktazidogen	ohne Laktazidogen	
1	110	118,2	50,0	Extrakt frisch
2	110	134,2	63,7	„ frisch
3	110	79,7	33,2	„ 5 Std. alt
4	90	63,4	28,3	„ 24 Std. alt

L a k t a z i d o g e n s t e i g e r t d i e E x t r a k t a t m u n g b e t r ä c h t l i c h. Es ist daher im Extrakt eine s p e z i f i s c h e Dehydrase für Laktazidogen enthalten. Bei Verwendung eines 5 S t u n d e n a l t e n E x t r a k t e s (Versuch 3 Tabelle 16) wird diese Steigerung ebenso wie im Parallelversuch ohne Laktazidogen geringer.

Ein Vergleich von Tabelle 16 mit Tabelle 1 zeigt eine sehr interessante Erscheinung:

Während dort Laktatzugabe zu älterem Extrakt keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches mehr bringt, bekommt man diese ebenso wie bei den Kochsaftversuchen auch mit Laktazidogen (siehe Versuch 3 und 4 Tabelle 16).

Zur Erklärung dieser Abweichung könnte man vielleicht daran denken, daß die atmungssteigernde Wirkung von Laktazidogen n i c h t a l l e i n auf seiner Dehydrierbarkeit im Extrakt bei

Gegenwart des Sauerstoffüberträgers beruht. Für diese Annahme sprechen Versuche, die ich in folgender Zusammensetzung ausführte:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Laktazidogen-Na 2% + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%.

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Laktazidogen-Na 2% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 17

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		Laktazidogen mit Methylenblau	Laktazidogen o. Methylenblau	
1	100	96,3	83,1	Extrakt frisch
2	110	103,0	92,7	„ „

Die beiden Versuche von Tabelle 17 zeigen, daß Methylenblau die „Laktazidogenatmung" nicht wesentlich mehr zu steigern vermag. Dies läßt vermuten, daß Laktazidogen für seinen oxydativen Abbau einen besonderen Mechanismus bevorzugt oder nötig hat.

Auch bei den Versuchen mit Kochsaft beobachtete ich, daß Methylenblau die ohnedies große Atmung kaum steigern konnte. Die Resultate dieser Versuche enthält Tabelle 18.

Zusammensetzung dieser Versuche:

Manometergefäß I: 1 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%.

Manometergefäß II: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Kochsaft + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 18

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Kochsaft mit Methylenblau	Kochsaft ohne Methylenblau
1	100	165,8	151,2
2	70	120,9	116,3

Die geringe Steigerung durch Methylenblau sowie bei den Versuchen von Tabelle 17 als auch denen von Tabelle 18 ist auf die im Extrakt und Kochsaft enthaltene Milchsäure zurückzuführen. Diese wird bei Anwesenheit von Methylenblau dehydriert. Demgemäß würde der künstliche Wasserstoffakzep-

tor bei der Oxydation des Laktazidogens und der Kochsaftbrennstoffe im Extrakt überhaupt keine Rolle spielen. Es liegt die Vermutung nahe, daß Laktazidogen und Donatorsubstanzen des Kochsaftes ohne Sauerstoffüberträger und künstlichen Wasserstoffakzeptor oxydiert werden.

Wie ich schon erwähnte, nimmt auch die „Laktazidogenatmung" mit dem Alter des Extraktes ab. Da aber Methylenblau bei der Laktazidogendehydrierung eine untergeordnete Rolle spielt, liegt dies nicht am Zugrundegehen des Sauerstoffüberträgers in der Fermentlösung. Anscheinend verliert die Dehydrase für Laktazidogen ihre Wirksamkeit rascher als die Milchsäuredehydrase.

Ich komme nun auf meine Feststellung zurück, nach der Kochsaft auch beim 5 Stunden alten Extrakt ohne Zugabe von Methylenblau (Kochsaft enthält Milchsäure!) noch eine Atmungssteigerung bringt. (Bekanntlich ist dies ja bei Laktatzusatz nicht mehr der Fall.) Wenn die Donatorsubstanzen des Kochsaftes zu ihrem Abbau keines Sauerstoffüberträgers bedürfen, ist es verständlich, daß Kochsaft auch noch bei älterem Extrakt eine Steigerung der Atmung verursacht, denn die Dehydrierung der Donatorsubstanzen im Kochsaft wäre ja unabhängig von dem zugrundegehenden trägen Sauerstoffüberträger des Extraktes. (Dies gilt auch für die „Laktazidogenatmung" im alten Hefeextrakt.) Da bekanntlich die „Kochsaftatmung" im älteren Extrakt sinkt, muß gefolgert werden, daß die Dehydrasen für die Donatorsubstanzen des Kochsaftes nicht so resistent sind wie die Milchsäuredehydrase.

Aus den Versuchen der Tabelle 15 ging hervor, daß Methylenblau die cyanvergiftete „Kochsaftatmung" nur teilweise kompensiert. Man muß freilich berücksichtigen, daß zu den Versuchen von Tabelle 15 nur halb so viel Extrakt und Kochsaft verwendet wurde als zu denen von Tabelle 13, und daß die Dehydrierung der Donatorsubstanzen bei der starken Alkaleszenz empfindlich ist. Aber dennoch läßt ein Vergleich dieser Versuchsresultate eine Differenz in der Atmungsgröße erkennen. Wie ist diese zu erklären?

Nachdem ich die Hypothese machte, daß Laktazidogen und die Donatorsubstanzen des Kochsaftes zu ihrer Dehydrierung im

Extrakt eines Sauerstoffüberträgers nicht bedürfen, beruht die Atmungsvergiftung nicht auf einer Schädigung des Sauerstoffüberträgers. Es ist also verständlich, daß Methylenblau nicht kompensieren kann. Die geringe Kompensierung der cyanvergifteten „Kochsaftatmung" würde also lediglich durch die im Kochsaft vorhandene Milchsäure entstehen.

Ueber die Wirkung von Adenylsäure auf Hefeextrakt.

Für die folgenden Versuche wurde eine 2%ige Lösung von adenylsaurem Natrium, die ich durch Fällung mit Schwefelsäure und anschließender Neutralisation mit Natriumlauge aus dem von Hahn, Fischbach und Haarmann (18) isolierten Bariumsalz der Adenylsäure aus Muskelkochsaft herstellte, verwendet.

Versuchszusammensetzung:

Manometergefäß I enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm adenylsaures Na 2%.
Manometergefäß II enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Resultate:

Tabelle 19

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit Adenylsäure	ohne Adenylsäure
1	1	62	75,6
2	1	73,8	78,1

Adenylsäure vermehrt die Sauerstoffzehrung nicht. Bei den Versuchen mit adenylsaurem Natrium bekommt man im Gegenteil etwas kleinere Werte.

Auch bei Gegenwart von Methylenblau bringt Adenylsäure keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches. Im Hefeextrakt ist also keine Dehydrase für Adenylsäure enthalten.

Die Methylenblauversuche folgender Zusammensetzung enthält Tabelle 20:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%ig + 0,5 ccm adenylsaures Na (2%).
Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%ig + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 20

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Methylenblau mit Adenylsäure	Methylenblau ohne Adenylsäure
1	80	82,2	85,2
2	80	54,8	55,0

Auf Grund von Untersuchungen von Deuticke (7) über Adenosintriphosphorsäure könnte vielleicht Adenylsäure als Aktivator für irgendwelche Dehydrierung einer Kochsaftsubstanz gelten. Diese eventuell aktivierende Funktion der Adenylsäure untersuchte ich für die „Laktazidogenatmung" des Extraktes. Aus den Versuchen der Tabelle 21 ist zu entnehmen, daß die „Laktazidogenatmung" in Gegenwart von Adenylsäure nicht größer wird. Ob die Adenylsäure bei der Dehydrierung anderer, unbekannter Donatorsubstanzen des Kochsaftes eine Rolle spielt, ist aber immerhin möglich.

Die Versuche von Tabelle 21 waren folgend zusammengesetzt:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Laktazidogen-Na 2%ig + 0,5 ccm adenylsaures Na (2%).

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Laktazidogen-Na 2% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 21

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		Laktazidogen mit Adenylsäure	Laktazidogen ohne Adenylsäure
1	1½	83,6	84,2
2	1½	79,1	81,3

Ueber den Einfluß von Hexosediphosphorsäure auf Hefeextrakt

Zu den Versuchen wurde das Kandiolin-Natrium-Präparat der I.-G.-Farben-Werke AG. benützt, für dessen Ueberlassung ich bestens danke.

Versuchsansätze:

Manometergefäß I enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Hexosediphosphorsäure 2%ig.

Manometergefäß II enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 22

No.	Versuchsdauer in Std.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		mit Hexosediphosphorsäure	ohne Hexosediphosphorsäure	
1	1	191,7	52,2	Extrakt frisch
2	2	206,1	68,6	„ „
3	1	55	47,6	„ 1 Tag alt
4	1	47,8	39,2	„ 1 Tag alt

Hexosediphosphorsäure steigert die Atmung des frischen Extraktes. Im Hefeextrakt ist also eine Dehydrase für Hexosediphosphorsäure. Bei Verwendung eines älteren Extraktes bringt aber Hexosediphosphorsäure fast keine Atmungssteigerung mehr. Daran ist sicher einmal das Zugrundegehen des Sauerstoffüberträgers schuld. Aber auch eine Schädigung der Hexosediphosphorsäuredehydrase würde natürlich die Dehydrierung der Hexosediphosphorsäure aufheben. Liegt jedoch eine solche nicht vor, so muß Hexosediphosphorsäure in einem Tag alten Extrakt bei Gegenwart von Methylenblau die Sauerstoffzehrung von neuem beleben. Die Versuche von Tabelle 23 zeigen, daß eine Steigerung wie bei Verwendung eines frischeren Extraktes und Gegenwart von Methylenblau nicht mehr zu erzielen ist (vgl. Versuch 3 Tabelle 23). Somit ist also die Hexosediphosphorsäuredehydrase fast unwirksam geworden. Wie bereits angeführt, ist auch die Dehydrase für Laktazidogen nicht so haltbar wie Milchsäuredehydrase. Dies bestätigt die von Hahn, Fischbach und Niemer (20) in Mikroversuchen mit Extrakt und Methylenblau gemachten Beobachtung, wonach die Restreduktion im Extrakt sich rascher verschlechtert als bei Gegenwart von Laktat. Die Verfasser erklären diese Tatsache mit der besseren Haltbarkeit der Milchsäuredehydrase als die anderer, auf unbekannte Stoffe des Extraktes eingestellte Dehydrasen, welche nur in geringer Menge vorkommen.

Hahn und Mitarbeiter (20) fanden bei Zusatz von Hexosediphosphorsäure zu den Entfärbungsversuchen mit Methylenblau und Extrakt keine raschere Entfärbung als im Nullversuch. Dies ist in der verschiedenen Empfindlichkeit der Methylenblaumethode und der Atmungsversuche begründet.

Zusammensetzung der Versuche für Tabelle 23.

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Hexosediphosphorsäure 2%ig.

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 23

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		Methylenblau mit Hexosediphosphorsäure	Methylenblau ohne Hexosediphosphorsäure	
1	60	57,7	45,3	Extrakt 24 Std. alt
2	60	53,1	42,8	„ 24 Std. alt
3	80	128,3	81,1	„ 5 Std. alt

Ueber den Einfluß von Zitronensäure auf Hefeextrakt

Die Versuche führte ich in folgender Zusammensetzung aus:

Manometergefäß I enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm zitronensaures Na 1%ig.

Manometergefäß II enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 24

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		mit Zitronensäure	ohne Zitronensäure	
1	70	44,7	42,6	Extrakt frisch
2	60	100,9	111,3	„ „

Natriumcitrat vermehrt die Extraktatmung nicht. Gibt man dagegen Methylenblau zum Versuch, so steigert Zitronensäure die Sauerstoffzehrung (siehe Tabelle 25).

Es muß also im Extrakt ein dehydrierendes Ferment für Zitronensäure vorhanden sein, allerdings in viel geringerer Menge als Milchsäuredehydrase.

Da Zitronensäure erst bei Gegenwart von Methylenblau die Extraktatmung fördert, scheint der Sauerstoffüberträger des Extraktes für den oxydativen Abbau der Zitronensäure nicht zu genügen.

Zusammensetzung der Versuche von Tabelle 25:

Manometergefäß I enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25%ig + 0,5 ccm zitronensaures Na 1%ig.

Manometergefäß II enthielt: 1,0 ccm Extrakt + 0,5 ccm Methylenblaulösung 1,25% + 0,5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 25

No.	Versuchs-dauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		Methylenblau mit Zitronensäure	Methylenblau ohne Zitronensäure	
1	80	72,0	45,3	Extrakt 5 Std. alt
2	80	175,9	100,9	„ frisch

Ueber den Einfluß von Bernstein-Fumar- und Aepfelsäure auf Hefeextrakt.

1. Der Einfluß der Bernsteinsäure

Hahn, Fischbach und Niemer (20) stellten durch Methylenblauentfärbungsversuche, die an Stelle von Extrakt eine Suspension von Hefe enthielten, fest, daß die Hefezelle eine sehr wirksame Bernsteinsäuredehydrase enthält, welche aber nicht in den Extrakt geht. In Uebereinstimmung damit bringt Bernsteinsäurezusatz bei den Atmungsversuchen mit Hefeextrakt keine Steigerung des Sauerstoffverbrauches; (siehe Tabelle 26) im Hefeextrakt ist somit keine Succinodehydrase enthalten.

Versuche der Tabelle 26 und ihre Zusammensetzung:

Manometergefäß I enthielt: 1,5 ccm Extrakt + 0.5 ccm Bernsteinsäure 2%.
Manometergefäß II enthielt: 1.5 ccm Extrakt + 0.5 ccm Phosphatpufferlösung (m/15; $p_H = 7$).

Tabelle 26

No.	Versuchs-dauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm		Bemerkungen
		mit Bernsteinsäure	ohne Bernsteinsäure	
1	120	98,0	92,0	Extrakt frisch
2	120	87,7	83,1	„ 5 Std. alt
3	70	53,2	48,7	„ frisch

2. Der Einfluß der Fumarsäure

Aus Tabelle 27 geht hervor, daß Fumarsäure die Extraktatmung nicht vergrößert. Die Versuche hatten dieselbe Zusammensetzung wie die Bernsteinsäureversuche. Einen Versuch führte ich mit Methylenblau aus. Aber auch in Gegenwart des künstlichen Wasserstoffakzeptors beeinflußte Fumarsäure die Atmung nicht.

Tabelle 27

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit 1% Fumarsäure	ohne Fumarsäure
1	70	34,4	37,5
2	60	42,8	45,6
3	80	41,2	44,7

3. Der Einfluß der Aepfelsäure

Auch Aepfelsäure steigert die Extraktatmung nicht. Die Versuchszusammensetzung war wie bei den Bernsteinsäureversuchen.

Tabelle 28

No.	Versuchsdauer in Min.	O_2 = Verbrauch in cmm	
		mit 1% Aepfelsäure	ohne Aepfelsäure
1	60	66,3	74,2
2	80	63,4	60,5

Schluß

Die Versuche lassen die Extraktatmung vom Gesichtspunkt der Dehydrierung aus gerechtfertigt erscheinen. Wir haben gesehen, daß sowohl die Hefezelle als auch der Hefeextrakt spezifische Dehydrasen enthalten, daß ferner für die Oxydation der Milch- und Hexosediphosphorsäure ein künstlicher Wasserstoffakzeptor oder der hypothetische Sauerstoffüberträger erforderlich ist, während Zitronensäure im Extrakt erst bei Gegenwart von Methylenblau abgebaut wird. Die Dehydrierung anderer Stoffe dagegen wie Laktazidogen und Donatorsubstanzen des Kochsaftes erfolgt im Hefeextrakt sehr wahrscheinlich ohne Sauerstoffüberträger. Der Atmungsmechanismus der Extraktatmung ist also weder in seiner Dehydrierungsphase noch in seinem intermediären Wasserstofftransport einheitlich.

Zusammenfassung

1. Hefeextrakt hat eine geringe, aber außerhalb der Fehlergrenze liegende Sauerstoffzehrung.

2. Dieser Sauerstoffverbrauch erfährt eine beträchtliche Steigerung bei Gegenwart von Methylenblau. Da-

gegen steigern Orthodinitrobenzol, oxydiertes Glutathion und Brenzkatechin die Extraktatmung nicht.

3. Milchsäure und Hexosediphosphorsäure fördern nur die Sauerstoffzehrung des frischen Extraktes. Laktazidogen und Muskelkochsaft wirken sowohl im frischen als auch im älteren Extrakt atmungssteigernd. Zitronensäure beeinflußt die Extraktatmung nur bei Gegenwart von Methylenblau.

4. Methylenblau steigert die „Laktazidogen- und Kochsaftatmung" nicht.

5. Adenyl-, Bernstein-, Fumar- und Aepfelsäure bringt keinen größeren Sauerstoffverbrauch des Extraktes.

6. Blausäure bringt die reine Extrakt- und „Kochsaftatmung" zum Stillstand, während sie die Methylenblauatmung des Hefeextraktes nur zu zirka 50% hemmt.

7. Phenylurethan narkotisiert die Atmung der Hefezelle zu zirka 50%, die Extraktatmung und die Methylenblauatmung des Extraktes dagegen nicht.

Am Ende meiner Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. Hahn verbindlichst für die gütige Ueberlassung des Themas und die mir erteilten Ratschläge. Eine ebenso angenehme Pflicht ist es mir, Herrn Dr. Fischbach für die Anleitung zu den Versuchen und deren Förderung meinen herzlichsten Dank abzustatten.

Literatur-Verzeichnis.

1. Abdershalden: Biochem. Arbeitsmeth. VIII. 33 (1915).
2. Ahlgreen: Skandin. Archiv **41**, 1 (1921).
3. Derselbe: Skand. Arch. (Supplemt.) **47**, 1 (1925).
4. Bach u. Michlin: Ber. **60**, 827 (1927).
5. Batelli u. Stern: Biochem. Z. **30**, 172 (1911).
6. Bertho: Liebigs Annalen **494**, 159 (1932).
7. Deuticke: H. S. **192**, 193 (1930).
8. Fischer: Ber. **60**, 2257 (1927).
9. Hahn u. Haarmann: Zeitschrift für Biol. **86**, 523 (1927).
10. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **87**, 107 (1928).
11. Hahn, Fischbach u. Haarmann: Zeitschr. f. Biol. **87**, 465 (1928).
12. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **88**, 89 (1928).
13. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **88**, 91 (1928).
14. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **88**, 516 (1929).
15. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **88**, 577 (1929).
16. Hahn u. Haarmann: Zeitschrift für Biol. **89**, 332 (1929).
17. Dieselben: Zeitschrift für Biol. **90**, 231 (1930).
18. Hahn, Fischbach u. Haarmann: Zeitschr. f. Biol. **91**, 315 (1931).
19. Hahn, Fischbach u. Niemer: Zeitschr. f. Biol. **93**, 121 (1932).
20. Dieselben: Der Abbau der Milchsäure durch Hefefermente 1. Mitteilung Zeitschr. f. Biol. (im Druck).
21. Hopkins: Ber. Phys. Band 9 (1922).
22. Meyerhof: Pflüg. Arch. **149**, 271 (1913).
23. v. Szent-Györgyi: Biochem. Z. **150**, 195 (1924).
24. Thunberg: Skandin. Arch. **35**, 163 (1918).
25. Derselbe: Skandin. Arch. **40**, 1 (1920).
26. Warburg: Biochem. Z. **119**, 134, (1921).
27. Derselbe: Biochem. Z. **152**, 477 (1924).
28. Derselbe: B. **58**, 1001 (1925).
29. Derselbe: Biochem. Z. **214**, 19, 101, 107 (1929).
30. Derselbe: Biochem. Z. **238**, 131, a **242**, 206 (1931).
31. Wieland: Ergebnisse der Physiologie B. **20** (1922).

Lebenslauf.

Ich, Otto Frey, wurde am 23. April 1909 als Sohn des Gutsverwalters Otto Frey und seiner Ehefrau Maria, geb. Glaser, in Stuttgart geboren. Vom 6. bis 11. Lebensjahr besuchte ich die katholische Volksschule in Göppingen und trat im Jahre 1920 daselbst in die Oberrealschule über, wo ich im März 1929 die Reifeprüfung ablegte. Darauf widmete ich mich in München dem Studium der Zahnheilkunde und bestand nach 3 Semestern das zahnärztliche Physikum. Nach weiteren 4 klinischen Semestern legte ich im Herbst 1932 an der Universität München das zahnärztliche Staatsexamen ab.

Lebenslauf.

Ich, Otto Frey, wurde am 23. April 1900 als Sohn des Gutsverwalters Otto Frey und seiner Ehefrau Maria, geb. Glaser, in Stuttgart geboren. Vom 6. bis 11. Lebensjahr besuchte ich die katholische Volksschule in Göppingen und trat im Jahre 1920 daselbst in die Oberrealschule über, wo ich im März 1920 die Reifeprüfung ablegte. Darauf widmete ich mich in München dem Studium der Zahnheilkunde und bestand nach 3 Semestern das zahnärztliche Physikum. Nach weiteren 4 klinischen Semestern legte ich im Herbst 1923 an der Universität München das zahnärztliche Staatsexamen ab.